

(51) Int. Cl. <sup>7</sup>	識別符号	P I	特許出願 (参考)
A 6 1 L 15/16 15/64		A 6 1 L 15/01 15/04	

審査請求 未請求 予備審査請求 有 (全 31 頁)

(21) 出願番号	特願平10-503912	(71) 出願人	ジョンソン・アンド・ジョンソン・メディカル・リミテッド
(36) (22) 出願日	平成9年6月27日 (1997. 6. 27)		イギリス国、イーエイチ2・4エヌエイチ・エジンバラ、クイーン・ストリート 68-73、エアスカイン・ハウス
(85) 翻訳文提出日	平成10年12月25日 (1998. 12. 25)	(72) 発明者	ワット、ポール、ウィリアム
(86) 国際出願番号	P C T / G B 9 7 / 0 1 7 2 5		イギリス国、ビーディー23・3イーディン・スクリプトン、ベック・サイド 9
(87) 国際公開番号	W O 9 8 / 0 0 1 8 0	(72) 発明者	ハーベイ、ウィルソン
(87) 国際公開日	平成10年1月8日 (1998. 1. 8)		イギリス国、ビーディー23・3ディーダブリュ・カールトン、ウェストウッド 53
(31) 優先権主張番号	9 6 1 3 6 8 2 . 5	(74) 代理人	弁理士 田澤 博昭 (外1名)
(32) 優先日	平成8年6月28日 (1996. 6. 28)		
(33) 優先権主張国	イギリス (GB)		

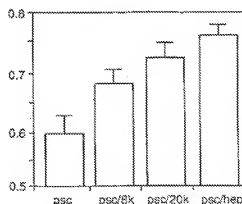
最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 慢性創傷治療のための酸化セルロースおよびその複合体の使用

## (57) 【要約】

本発明は、慢性創傷処置用の創傷ドレッシングの製造のための、酸化セルロース、好ましくは酸化再生セルロース (ORC)、および酸化セルロースとコラーゲン等の構造タンパク質との複合体の使用に関する。このドレッシングは創傷ドレッシングとして創傷表面に直接適用するために適したORC繊維、織布または不織布、あるいは分散されたORC繊維または粉末を含有した局所適用するための半固体状軟膏、あるいはコラーゲン/ORCスポンジであることが好ましい。この慢性創傷は静脈性潰瘍、褥瘡性潰瘍または糖尿病性潰瘍であることが好ましい。

FIG. 1



【特許請求の範囲】

1. 傷性創傷処置用の医薬品の製造のための酸化セルロースの使用。
2. 酸化セルロースは創傷液に溶けない、織った繊維体、織らない繊維体または編んだ繊維体の形態である請求項1に記載の使用。
3. 前記酸化セルロースは分散された繊維または粉末の形態である請求項1または請求項2のいずれか1項に記載の使用。
4. 前記繊維または粉末は局所適用するための半固体状態形態中に分散される請求項3に記載の使用。
5. 酸化セルロースの平均分子量は50,000よりも大きい請求項1乃至請求項4のいずれか1項に記載の使用。
6. 酸化セルロースは酸化再生セルロース（ORC）を含む請求項1乃至請求項5のいずれか1項に記載の使用。
7. 酸化セルロースは構造タンパク質と複合体形成する請求項1乃至請求項6のいずれか1項に記載の使用。
8. 酸化セルロースとタンパク質（存在する場合）は合わせて該材料の少なくとも75重量%を構成する請求項4に記載の使用。
9. 酸化セルロースとタンパク質（存在する場合）は合わせて該材料の少なくとも90重量%を構成する請求項8に記載の使用。
10. 該材料は凍結乾燥または溶媒乾燥したスポンジである請求項7、請求項

8または請求項9に記載の使用。

11. 該材料は固体状フィルムである請求項7、請求項8または請求項9に記載の使用。

12. タンパク質の酸化セルロースに対する重量比は1：99乃至99：99：1である請求項7乃至請求項11のいずれか1項に記載の使用。

13. タンパク質の酸化セルロースに対する重量比は1：10乃至99：9：1である請求項12に記載の使用。

14. タンパク質はコラーゲン、フィブロネクチン、フィブリン、ラミニンまたはエラスチンを含む請求項7乃至請求項13のいずれか1項に記載の使用。

15. タンパク質は実質的にコラーゲンより成る請求項14に記載の使用。
16. タンパク質は、分子量が5,000乃至100,000の範囲にある部分加水分解された可溶性コラーゲンである請求項14または請求項15に記載の使用。
17. コラーゲンは繊維性の実質的に不溶なコラーゲンである請求項14または請求項15に記載の使用。
18. 酸化セルロースは、分子量が5,000乃至50,000の範囲にある水溶性の酸化セルロース断片を含む請求項1乃至請求項17のいずれか1項に記載の使用。
19. 前記慢性創傷は、静脈性潰瘍、褥瘡性潰瘍および糖尿病性潰瘍より成る群から選択される請求項1乃至請求項18のいずれか1項に記載の使用。

20. 生物試料または生物から細胞増殖因子を分離する方法であって、  
(i)前記生物試料または生物を、酸化セルロースあるいは酸化セルロースと構造タンパク質との複合体を含む材料に生体内または生体外で接触させて、その増殖因子を該材料に結合させること、および  
(ii)その結合した増殖因子を該材料から回収することを含む方法。
21. 活性な創傷ドレッシング材料を製造する方法であって、  
(i)酸化セルロースあるいは酸化セルロースと構造タンパク質との複合体を、細胞増殖因子を含有した生物媒体に接触させて、その細胞増殖因子を該材料に結合させる工程、および  
(ii)その細胞増殖因子が結合した該材料を洗浄し乾燥して、前記活性創傷ドレッシング材料を形成する工程を含む方法。
22. 前記細胞増殖因子は血小板由来増殖因子を含む請求項20または請求項21に記載の方法。
23. 慢性創傷に対して局所適用するための滅菌包装した半固体状またはゲル状軟膏であって、0.05%W/V乃至50%W/Vの酸化セルロースを含む軟膏。
24. 慢性創傷に対して適用するための生吸収性スポンジであって、0.1%

W/W乃至50%W/Wの酸化セルロースと、50%W/W乃至99.9%W/Wの1種以上の構造タンパク質を含むスポンジ。

#### 【発明の詳細な説明】

慢性創傷治療のための酸化セルロースおよびその複合体の使用

本発明は慢性創傷(chronic wound)治療のための酸化セルロース(oxidized celluloses)および酸化セルロースとコラーゲン等の構造タンパク質との複合体(complexes)の使用に関する。

酸化セルロースはセルロースの酸化、例えば四酸化二窒素を用いた酸化により製造される。この製法はその糖残基上の第一アルコール基をカルボキシル基に転換し、そのセルロース鎖内にウロン酸残基を形成するものである。この酸化は完全な選択性をもって進行せず、その結果、2位および3位炭素上のヒドロキシル基がケトン形に転換される場合がある。これらのケトン単位はアルカリ不安定複合を導出し、これがpH7以上で、ラクトン生成と糖環開裂を通じて該高分子の分解を開始させる。その結果、酸化セルロースは生理的条件下で生分解性、生吸収性である。

実際の用途に好適な酸化セルロースは、レーヨン等の再生セルロースの酸化によって製造された酸化再生セルロース(oxidized regenerated cellulose: ORC)である。ORCが止血特性を有することが以前から知られている。ORCはSURGICEL(登録商標・ジョンソン・エンド・ジョンソン・メディカル社[Johnson & Johnson Medical, Inc.])とよばれる止血製品として1950年から入手可能である。この製品は綿んだレーヨン材料の酸化によって製造される。

多孔性、密度および細孔パターンの改良は、第二のORC布製品INTERCEED(登録商標・ジョンソン・エンド・ジョンソン・メディカル社)の事業開始につながり、これが腹部手術における術後癒着(post-surgical adhesions)の程度を減少させることが示された。

米国特許公報第2517777号(Doubra)は、ORCをトロンビンで含浸することによって得られた改善された止血性材料を記載している。

欧州特許公開第0437095号は、合成した酸性ORC材料を酢酸ナトリウム等の弱有機酸の塩基性塩の溶液と接触させることによって調整した中和されたORC材料を記載している。その結果生じた生成物は止血および癒着防止が示さ

れている。

動物起源の構造タンパク質であるコラーゲンは、創傷ドレッシング (wound dressing) として用いるために種々の形態で知られている。

英特許公開第 1 5 1 5 9 6 3 号は医療および手術用途、血管移植および整形手術用プロテーゼ (補綴具) において用いるための架橋したコラーゲン-ムコ多糖複合材料を記載している。この複合材料は、コラーゲンと不可逆的に結合したムコ多糖を少なくとも 0.5 重量%で含有する。このムコ多糖は、ヒアルロン酸、コンドロイチン硫酸、ヘパリン硫酸等のヘキシミン残基を含有する動物性多糖である。この複合材料は、単なるコラーゲン材料よりも大きな破収抵抗性と良好な血液適合性を示すと記載されている。

米国特許公開第 4 6 1 4 7 9 4 号は、コラーゲンとアルギン酸ナトリウム等のポリアニオン性植物性多糖との間で形成された複合体を記載している。この複合体は、該タンパク質の等電点よりも高くない pH で該タンパク質と該多糖を化学させることによって形成されるのが好ましい。この結果生じた複合体は創傷ドレッシングを含め多種多様な医療および手術用途に適していると記載しているが、ポリアニオン性植物性多糖の代わりに酸化セルロースを使用することについての開示はない。その明細書は、コラーゲン以外のフィブリンまたはエラスチン等のタンパク質を有用なタンパク質/多糖複合体の形成に使用し得ることも教示している。

英特許公開第 2 2 8 0 8 5 0 号は、ORC でもよい生吸収性高分子のフィルムで補強した医療用コラーゲンを含む薬剤剤外用の医療用インプラントを記載している。このコラーゲンマトリックスは分散した ORC 繊維もしくは断片を含有してよい。

上述のコラーゲンもしくはコラーゲン/多糖創傷ドレッシング材料は重要な利点を与える。これらの材料は (化学的に変更される場合はあるが) 天然の生物起源のものであり、したがって低い免疫原性を有する傾向にある。これらの材料は一般的に生吸収性であり、従来の創傷ドレッシング材料の創傷表面からの除去に関連する外傷を減少させる。さらに、これらの材料のいくつかは創傷治癒に対し

て積極的な治療効果を有することができる。例えば、ヒアルロン酸等のいくつかの動物性ムコ多糖は、繊維芽細胞等の創傷治癒細胞に対して走化性効果を及ぼし、それによりこのような細胞の増殖と寛達を促進すると考えられている。しかしながら、この一般型の改善された創傷ドレッシング材料であって、物理特性と生物吸収速度の一層良好な調節、創傷治癒に対する一層良好な治療効果およびコスト低減を示すものに対し、依然としてニーズがある。

本発明一つの目的は、哺乳動物、特にヒトの慢性創傷、例えば、静脈性潰瘍(venous ulcers)、褥瘡性潰瘍(decubitus ulcers)、糖尿病性潰瘍(diabetic ulcers)用の改善された創傷ドレッシング材料を提供することである。そのような慢性創傷は出血(bleeding)や他の体組織への癒着(adhesion)をほとんど示さないが、全く示さないのが一般的であり、従って、そのような創傷の処置に対して酸化セルロースはこれまで示されていない。

酸化セルロースが慢性創傷の処置に対して有効な創傷ドレッシング材料であることが、今、見出された。

従って、本発明は慢性創傷処置用の創傷ドレッシング材料の製造のための酸化セルロースの使用を提供するものである。

この酸化セルロースは酸化再生セルロース(ORC)であることが好ましい。酸化セルロースは創傷液に溶けない凝った繊維体、凝らない(不凝)繊維体または凝んだ繊維体の形態であることが好ましい。例えば、酸化セルロースは当業界で知られたSURGICEL(登録商標)もしくはINTERCEED(登録商標)布の一つの形態であることが好ましい。他の好ましい実施形態において、酸化セルロースはミル(粉碎)した繊維のような繊維の形態または粉末の形態であり、適切な局所医薬品賦形剤中に分散されるのが好ましい。

この酸化セルロースの平均分子量は50、000より大きいことが好ましい。そのような酸化セルロースは創傷液中で実質的に不溶ではあるが、生理的pHで生吸収性断片への非常に徐々に分解を受ける。

この酸化セルロースは中和されないことが好ましい。しかし、本発明は、上記慢性創傷処置用の医薬品の製造のために、欧州特許公開第0437095号に記

被された部分的にまたは完全に中和された材料を使用することも包含する。

この酸化セルロースは前記創傷ドレッシング材料中で硬造タンパク質と複合体形成するのが好ましい。

このタンパク質（存在する場合）と酸化セルロースは合わせて、該創傷ドレッシング材料の少なくとも 75 重量%を構成することが好ましく、該材料の少なくとも 90 重量%を構成することがより好ましい。該材料の他の成分は、0 重量%乃至 25 重量%の 1 種以上の他の生体適合性多糖、例えば、アルギン酸ナトリウム、アルギン酸カルシウム等のアルギン酸塩、デンプングリコール酸ナトリウム (sodium starch glycolate) 等のデンプン誘導体、メチルセルロース、カルボキシメチルセルロース等のセルロース誘導体、またはヒアルロン酸もしくはその塩、コンドロイチン硫酸、ヘパラン硫酸等のグリコサミノグリカンを含んでもよい。該材料はまた、20 重量%まで、好ましくは 10 重量%までの水を含んでもよい。

い。該材料はまた、0 重量%乃至 40 重量%、好ましくは 0 重量%乃至 25 重量%の可塑剤、好ましくはグリセロール等の多価アルコールを含んでもよい。該材料はまた、0 重量%乃至 10 重量%、好ましくは 0 重量%乃至 5 重量%の 1 種以上の治療効果のある創傷治癒剤、例えば、非ステロイド抗炎症薬（例えばアセトアミノフェン）、ステロイド薬、抗生物質（例えばペニシリン、ストレプトマイシン）、抗菌剤（銀サルファジアジン (silver sulfadiazine)、クロロヘキシジン）、または成長因子（例えば繊維芽細胞増殖因子、血小板由来増殖因子）を含んでもよい。

このタンパク質の酸化セルロースに対する重量比は 1 : 99 乃至 99 : 99 : 1 であることが好ましい。その重量比は 1 : 10 乃至 99 : 9 : 1 の範囲にあることがより好ましく、また 2 : 1 乃至 95 : 1 の範囲にあることがさらに好ましい。

本発明による材料は、粉末 (powder)、小粒 (microspheres)、薄片 (flakes)、マット、膜 (film) 等のどのような便利な形態でもよい。しかし、本発明による材料は、局所適用するための半固体状またはゲル状の軟膏の形態、あるいは凍結乾燥または溶解乾燥したスポンジの形態であることが好ましい。



従って、本発明はまた、慢性創傷に対して局所適用するための滅菌包装した半固体状またはゲル状軟膏も提供し、ここにおいて前記軟膏は0.05%W/V乃至5.0%W/Vの酸化セルロースを含む。

この軟膏は医薬上許容可能なキャリア中に、好ましくは0.1%W/V乃至2.0%W/V、より好ましくは1%W/V乃至10%W/Vの酸化セルロースを含む。適切なキャリアとして、ヒドロキシエチルセルロース、ヒドロキシメチルセルロース、カルボキシメチルセルロース、ヒドロキシプロピルメチルセルロース、それらの混合物等のセルロース誘導体を含有するヒドロゲル、およびポリアクリル酸（カーボポール(Carbopols)）を含有するヒドロゲルが挙げられる。ま

た、適切なキャリアとして、局所医薬製造のために使用されるクリーム/軟膏、例えば、セトマクロゴール(cetomacrogol)乳化軟膏をベースにしたクリームも挙げられる。上記キャリアは、アレルギー性（濃縮剤または刺激物として）、ベンジルアルコール等の保存料、リン酸水素二ナトリウム/リン酸二水素ナトリウム等のpHを調節するための緩衝液、塩化ナトリウム等の浸透性を調整するための薬剤、EDTA等の安定化剤を含んでもよい。

この軟膏中の酸化セルロースは、本願で記載するようにタンパク質と複合体形成するのが好ましい。

本発明はさらに、慢性創傷に対して適用するための凍結乾燥または凍結乾燥した生吸収性スポンジも提供し、前記スポンジは0.1%W/W乃至5.0%W/Wの酸化セルロースと、5.0%W/W乃至99.9%W/Wの1種以上の構造タンパク質を含む。前記スポンジの平均孔径は10 $\mu$ m乃至500 $\mu$ mの領域にあるのが好ましく、約100 $\mu$ m乃至300 $\mu$ mの領域にあるのがより好ましい。

この発明の酸化セルロースと複合体形成するための適切なタンパク質として、フィブロネクチン、フィブリン、ラミニン、エラスチン、コラーゲン等の構造タンパク質が挙げられる。このタンパク質はコラーゲンを含むことが好ましく、実質的にコラーゲンより成ることがより好ましい。コラーゲンは、微生物資源を含め、どのような天然資源から得られたコラーゲンでもよいが、米国特許第4614794号および同第4320201号に記載されたように非コラーゲン成分。

例えば脂肪、非コラーゲンタンパク質、多糖および他の炭水化物が十分に除かれたウシ真皮から得られたコラーゲンであることが好ましく、それら特許の内容全体を参照により本願に取り入れる。コラーゲンはI型、II型もしくはIII型コラーゲンであってよく、また化学的に改変したコラーゲン、例えば、天然コラーゲンから免疫原性のテロペプチドを除去して得られたアテロコラーゲンであってもよい。コラーゲンはまた、既知の方法で天然コラーゲンのペプシン処理により得られた、分子量が5,000乃至100,000、好ましくは5,000乃至50

,000の範囲にある可溶性コラーゲンもしくは可溶性コラーゲン断片を含んでもよい。

この酸化セルロースは酸化再生セルロース（ORC）を含むことが好ましい。この酸化再生セルロース（ORC）は米国特許第3,122,479号に記載された方法により得ることができ、その特許の内容全体を参照により本願に取り入れる。この材料は、生体適合性、生分解性、非免疫原性および容易に購入可能であるという特徴を含め数多くの利点を与える。ORCは酸化の程度を変え、よって分解の速度を変えて利用することができる。ORCは織布、不織布または編布を含め不溶性繊維の形態で使用してよい。このORCは、他の好適な実施形態では、ORCのアルカリ加水分解により得られた水溶性の低分子量断片である。

このように或る範囲の調節可能な特性を有するコラーゲンとORC両方の容易な利用可能性は、本発明に使用されるこれらの材料の特性を課立って優れた程度まで調節できることを意味する。特に、該材料の生物吸収速度、有孔性および密度を調節することができる。

また、驚くべきことに、本発明の好適な実施形態において使用されるタンパク質/酸化セルロース複合体が成長因子、特に血小板由来増殖因子に対して優れた結合能を有することも見出された。従って、本発明は、1種以上の細胞増殖因子を結合するための酸化セルロースあるいは酸化セルロースと標的タンパク質との複合体の使用も提供するものである。この細胞増殖因子は血小板由来増殖因子（PDGF）であることが好ましい。

本発明はさらに、生物試料または生物から細胞増殖因子を分離する方法も提供し、この方法は、

(i) 生物試料または生物を、酸化セルロースあるいは酸化セルロースと上述の構造タンパク質との複合体を含む材料に生体内 (in vivo) または生体外 (in vitro) で接触させて、その増殖因子を該材料に結合させること、および

(ii) その結合した増殖因子を該材料から回収することを含む。

本発明はさらに、活性な創傷ドレッシング材料を製造する方法も提供し、この方法は、

(i) 酸化セルロースあるいは酸化セルロースと上述の構造タンパク質との複合体を、細胞増殖因子を含む生物媒体に接触させて、その細胞増殖因子を該材料に結合させる工程、および

(ii) その細胞増殖因子が結合した該材料を洗浄し乾燥して、前記活性創傷ドレッシング材料を形成する工程を含む。細胞増殖因子は血小板由来増殖因子を含むことが好ましい。

もう一つの形態において本発明は、褥瘡性潰瘍、静脈性潰瘍、糖尿病性潰瘍などの哺乳動物の慢性創傷の処置方法を提供する。この方法は、酸化セルロースあるいは酸化セルロースと上述の構造タンパク質との複合体を含むドレッシングを創傷に適用することを含む。

この酸化セルロースは慢性創傷に少なくとも1時間適用されるのが好ましく、より好ましくは少なくとも6時間、最も好ましくは少なくとも12時間適用される。この酸化セルロース処置は、慢性創傷のために必要であれば、酸化セルロースドレッシングを適当に覆えて、数日間または数週間に渡り延長してよい。このことは、数秒または数分だけしか通常経かないORCの止血用途とは好対照をなす。

いかなる理論にも拘束されることを望まないが、この酸化セルロースおよびその複合体は、以下の組織の少なくとも一部で慢性創傷治癒を促進すると考えられる。第一に、この酸化セルロースは、PDGF、EGF、FGF等の成長因子に結合してこれらの成長因子を創傷部位で保持する。そうでなければ、そのような

成長因子は創傷滲出液に沿って創傷部位から遠くへ運ばれる傾向がある。生理的 pH で酸化セルロースが徐々に分解する結果、成長因子が徐々に放出されて創傷

に届る。第二の理由は、この酸化セルロースが十分に生吸収性があり、生理学的受容性があることである。第三の理由は、この酸化セルロースの生体内(in vivo)分解により生成するオリゴ糖断片がそれ自体で慢性創傷治癒を促進することである。

この慢性創傷は、静脈性潰瘍、褥瘡性潰瘍および糖尿病性潰瘍より成る群から選択されることが好ましい。この慢性創傷は、実質的にまたは完全に非出血性(non-bleeding)であることが好ましい。この用語「慢性創傷」は、瘡瘍障害もしくは疾患を包含しない。

本発明で使用するタンパク質/酸化セルロース複合体は、タンパク質の水性分散液を供給する工程、酸化セルロースをその水性分散液に浸すまたは分散させる工程、次に、その水性分散液から水を除去して、酸化再生セルロースと複合体形成したタンパク質を含む材料を残す工程を含む方法によって製造することができる。

本発明による材料中の任意的、追加的成分は、水性分散液から水を除去する前に、その水性分散液中に含まれることが好ましい。

分散液の pH は pH 3 乃至 pH 4、5 に調整されるのが好ましい。この pH 範囲はコラーゲンの等電点 pH よりも小さい。

水は水性分散液から蒸発により除去することができ、例えば、トレイ内の分散液からの蒸発により材料フィルムを残すことができる。しかしながら、スポンジの形態の材料を得るため、凍結乾燥(lyophilizing)または溶媒乾燥(solvent-drying)により水を除去することが好ましい。水性分散液は 5 mg/ml 乃至 30 mg/ml のコラーゲンを含有することが好ましい。コラーゲンをベースとするスポンジは、実質的に米国特許公報第 2 1 5 7 2 2 4 号に記載されたように凍結乾燥により形成される。

この方法は、分散液中または乾燥材料中のタンパク質と多糖を、カルボジイミ

ド、ヘキサメチレンジイソシアナート（HMDI）、グルタルアルデヒド等の架橋剤で処理することをさらに含むのが好ましい。あるいは、架橋は熱的脱水素により（dehydrothermally）行ってもよい。架橋の方法は最終生成物に顕著に影響を与え得る。例えば、HMDI 架橋は複合体内のタンパク質の第一アミノ基を架橋するのに対し、カルボジイミド架橋はORCの脱水化物をタンパク質の第一アミノ基に架橋する。

酸化セルロースは、タンパク質の水性分散液に酸化セルロースの懸濁液または酸液の形態で加えてよく、好ましくは同等の pH でコラーゲン分散液に加えた後に攪拌または均質化（homogenisation）により混合することが好ましい。あるいは、酸化セルロースの乾燥した繊維もしくは布をコラーゲンの水性分散液に浸してもよい。

以下、本発明の具体的実施形態を図面を参照して実施例により、さらに説明するが図面において、

図1は、（a）ペプシン可溶性コラーゲン、（b）平均分子量8,000のORC断片と複合体形成したペプシン可溶性コラーゲン、（c）平均分子量約20,000のORC断片と複合体形成したペプシン可溶性コラーゲン、および（d）（比較のため）ヘパラン硫酸と複合体形成したペプシン可溶性コラーゲンより成る血清処理フィルムについて繊維芽細胞の細胞増殖（任意単位）のグラフを示し、

図2は、以下の材料：（a）プラスチック、（b）コラーゲンスポンジ、（c）コラーゲン/可溶性ORCスポンジ、（d）INTERCEED（登録商標）ORCに対する血小板由来増殖因子（PDGF）の結合率、およびこれらの材料からこの増殖因子の除去の容易性のグラフを示し、

図3は、コラーゲンスポンジおよびSURGICEL（登録商標）ORC布について（比較測定）、ならびに10重量%、20重量%および30重量%の繊維性ORCでそれぞれ複合体形成したコラーゲンのスポンジについて測定したMMP結合の相対量のグラフを示す。

実施例1：コラーゲン/繊維性ORCスポンジの調製

米国特許第4614794号および同第4320201号に記載されたように調製した、凍結乾燥したコラーゲンを、10mg/mlの濃度で冷0.05M酢酸中に再懸濁する。ミル（粉砕）したORC粉末（ミルしたSurgicel（登録商標）布地）を1:3のORC:コラーゲン比でその懸濁液に加え、ウォリングブレンダー(Waring Blender)を用いて乾速で3/30秒間ホモジェナイズ（均質化）した。この複合体懸濁液を真空オーブン中で10分間脱気し、次に3mmの深さまで注ぎ急速冷凍する。この冷凍した懸濁液を、温度均配(temperature ramping)設備と共にプログラム可能エドワーズ(Edwards)凍結乾燥器を用いて凍結乾燥し熱的脱水層により架橋するか、あるいは米国特許公報第2157524号に記載されたような溶媒乾燥法を用いて乾燥する。

#### 実施例2: コラーゲン/ORCオリゴ糖スポンジの調製

可溶性コラーゲンを、B. J. MillerおよびR. E. Rhodes「異なる型のコラーゲンの調製とキャラクタライゼーション (Preparation and Characterization of the Different Types of Collagen)」, *Methods Enzymol* Vol. 82, 第33頁乃至第64頁（1982年）の公衆された方法により調製する。ORCの可溶性オリゴ糖を、本願と同日に提出され、これと共通して譲渡された同時係属の特許出願に記載されたように調製する。簡潔に言えば、このORCオリゴ糖は、購入可能なORCを6M水酸化ナトリウム溶液により37℃で45分間処理し、次に中布および透析により分子量1000未満の断片と不純物を除去することによって調製する。その結果生じたORCの可溶性オリゴ糖を、可溶性コラーゲン（0.075mg/ml）に（共に冷0.05M酢酸中で）、新たな複合体の沈殿

が生じなくなるまで攪拌しながらゆっくりと加える。この複合体沈殿を遠心分離により分離し、pH7.2のリン酸緩衝液で洗浄し、そしてホモジェナイズ（均質化）により同じ緩衝液中30%W/Vで再懸濁する。この懸濁液を9mmの深さまで注ぎ、-30℃で急速冷凍し、凍結乾燥する。

#### 実施例3: コラーゲン/ORCフィルムの調製

懸濁液を沈殿させるのではなく冷凍や凍結乾燥というよりもむしろ空気乾燥させることを除いては最初の実施例のいずれかに記載した方法により、創傷

に適用するためのコラーゲン／ORCフィルムを調製する。柔軟なフィルムを調製するため、その懸濁液に少量のグリセロールを添加してよい。

実施例 4： ORCのプレ・ゲル化法を用いたコラーゲン／ORCフィルムの調製

ORC布 (SURGICEL) を、その布がゼラチン状態に転換されるのに充分な時間 H<sub>2</sub>O、0 の希アルカリ (NaHCO<sub>3</sub>) 中で懸濁する (4%W/V)。同じ pH でコラーゲンスラリーを加えて、1%W/V のコラーゲンと Surgice! (登録商標) 両方の最終固体含有量を得る。このスラリーを攪拌し、その pH を酢酸を用いて pH 3.0 乃至 pH 4.0 に調整する。この最終スラリーを型に入れ、冷凍し真空中で凍結乾燥する。

#### 実施例 5

静脈性潰瘍、褥瘡性潰瘍または糖尿病性潰瘍に適用するために適した創傷ドレッシングを、ジョンソン・エンド・ジョンソン・メディカル社から得た INTERCEE D (登録商標) 布の 5 cm × 5 cm<sup>2</sup> 切断によって調製する。

#### 実施例 6

創傷に局所適用するための創傷処置用ゲルを以下のように調製する。

1 mm スクリーンを通じて SURGICEL (登録商標) 布をミル (粉砕) し、その

結果生じた繊維を 3%W/W カルボキシメチルセルロース (CMC) 水性ゲル中に 3%W/W の濃度で分散させる。このゲルを、金属被覆ポリマーポーチ (袋) 内に包装し、γ線照射により滅菌する。

#### 実施例 7

静脈性潰瘍、褥瘡性潰瘍または糖尿病性潰瘍に適用するために適した中和 ORC 創傷ドレッシングを、欧州特許公開第 0 4 3 7 0 9 5 号に記載されたように調製した。簡単に言えば、ジョンソン・エンド・ジョンソン・メディカル社から INTERCEE D (登録商標) として入手可能な 15、2% のカルボキシル酸含有量をもった酸化再生セルロース (ORC) 布の 71、9 グラムの量を、穿孔された芯に巻き付け、循環ポンプを備えた反応器内に置いた。この反応器を 3 リットルの水と 2 リットルのメチルアルコールの混合液で満たした。溶液を外部循環させるた

めの組み込みポンプを備えたブルックフィールド(Brookfield) EX-100 恒温浴を作動し、穿孔芯の中心を通じて、またその芯に巻き付けた布のパイル(積重物)を通じてその溶剤をポンプで循環した。その溶剤は出口ラインを通じて流れ、再びポンプを通じて再循環され、芯に戻された。

その布のカルボキシル基のモル数に等しい化学量論量の酢酸ナトリウム三水和物をその溶液に加えた。すなわち、カルボキシル基の  $71.9 \times 15.2\% = 10.92$  グラムに相当する酢酸ナトリウム三水和物の  $33.05$  グラムである。

この  $33.05$  グラムの酢酸ナトリウム三水和物をそのアルコール水溶液に加え、布の周囲にまた布を通じて  $30$  分間ポンプで循環した。 $30$  分後、循環溶液の pH は一定値 (pH 4.0) に達した。次に、その布を反応器から取り出し、 $600$  ml のメタノール中に  $10$  分間浸した。このメタノールを除去し、別の  $600$  ml の新鮮なメタノールに取り換えた。この  $2$  回目の洗浄後、布を吊るして空気乾燥した。本発明による創傷ドレーシングとして用いるため、その布の  $5\text{ cm} \times 5\text{ cm}$  片を切斷した。

以上のように調製した本発明による材料の有利な特性は、以下のようにして決定された。

#### 手順 1: 繊維芽細胞の細胞増殖の促進

コラーゲン/アルカリ可溶性 ORC 複合体フィルムをベトリ皿内で実施例 2/実施例 3 に記載したように調製し、そして、そのフィルムに血清を注ぎ、 $37^\circ\text{C}$  で一晩インキュベート(保温)した。この血清を除去し、繊維芽細胞の細胞増殖に及ぼす効果を測定した(図 1)。ペプシン可溶性コラーゲン(PSC)フィルム(対照)、上述のように調製した PSC+平均分子量約  $8,000$  の ORC オリゴ糖および PSC+約  $20,000$  の ORC オリゴ糖、ならびに正の対照として含めた PSC+ヘパリンについて、細胞増殖を観察した。これらの結果は、コラーゲン/ORC 断片フィルムが、細胞増殖を刺激する血清由来の因子を結合するようにみえることを示す。

#### 手順 2: 血小板由来増殖因子の結合

PDGF 結合の研究を以下のように行った。



試験材料の小区分（INTERCED（登録商標）ORC布のおよそ $1\text{ cm}^2$ 正方形、およびコラーゲンスポンジのおよそ $1\text{ cm} \times 0.5\text{ cm} \times 0.4\text{ cm}$ 区分）の重量を計り、室温で少なくとも1時間、 $150\text{ mM}$ 塩化ナトリウム含有 $100\text{ mM}$ リン酸ナトリウム二塩基性緩衝液（合計量 $1\text{ ml}$ ）中に浸した。次に、試料をリン酸緩衝食塩水（PBS）中の $2\%$ ウシ血清アルブミン（BSA）と共に2時間室温でインキュベートした。次に、 $22\text{ ng}$ のPDGFを $2\%$ BSA含有PBS $250\text{ }\mu\text{l}$ 中の各試料に添加し、次に試料をさらに1時間 $37^\circ\text{C}$ でインキュベートした。次に、各試料をPBS $250\text{ }\mu\text{l}$ で3回洗浄した後、塩化ナトリウム濃度を増加させた。最後に、各試料を $4.0\text{ M}$ 尿素で洗浄した。当初(original)のPDGF濃製物および種々の洗浄物のPDGF ELISA分析を行った。図2に示したデータは、コラーゲンとORCの複合体からは該増殖因子を全体として回収できる一方、個々の構成要素は全ての該増殖因子を放出するようにみえないことを示す。結合特性もまた、個々の構成要素に比べて、コラーゲン/ORC

複合体が特異に異っている。これらの観察結果は、該複合体が特有のPDGF結合を有し、これを成長因子の外因性の結合および内因性の結合と放出の双方のために適切に利用し得ることを示す。

#### 手順3：マトリックスメタロプロテイナーゼ結合

コラーゲンとORCとの間の複合体形成がマトリックスメタロプロテイナーゼ(MMP)結合に及ぼす効果を以下のようにして評価した。

0重量%、20重量%および30重量%の繊維性ORCをそれぞれ含有したコラーゲン/繊維性ORCスポンジを、実施例1に記載した手順により調製した。比較のため、ORCの無いコラーゲンスポンジを調製した。比較のため、SURGICEL（登録商標）ORC布の試料も調製した。

簡潔に言えば、各試料 $50\text{ mg}$ を、タンパク質分解性緩衝液（ $50\text{ mM}$  トリス/HCl pH7.8,  $50\text{ mM}$   $\text{CaCl}_2$ ,  $0.5\text{ M}$   $\text{NaCl}$ ）中で $1:50$ に希釈した急性創傷液 $2.5\text{ ml}$ を含有した $15\text{ ml}$ プラスチックビーカーに入れ、振盪水浴上で3時間 $37^\circ\text{C}$ でインキュベートした。急性創傷液は、マトリックスメタロプロテイナーゼを含め種々のプロテイナーゼを含有しており、こ

これらの酵素の多くが選択的に種々のドレッシング材料に結合することになる。各材料が吸収した余分な液を、金属スパチュラを用いて機械的に絞り出し廃棄した。その残りのドレッシングを、前もって充填した2 ml シリンジ（各シリンジは0.5 ml 体積の2.5 mm ガラスビーズを含有する）に入れた。4 ml のタンパク質分解性緩衝液をシリンジに押し込み、1 ml のアリコート（等分）を廃棄した。この洗浄段階において、結合しないプロティナーゼおよびドレッシング材料に弱くしか結合しないプロティナーゼの全てがドレッシングから除去され、より強固に結合したものがドレッシングに残った。この緩衝液ですすいだドレッシングを次に別の15 ml プラスチックビーカーに移した。非毒性試料緩衝液（0.3 M 0.05 M トリス/HCl, c pH 6.8, 2.5 ml グリセロール, 0.5 g SDS, 16.2 ml 水およびプロモフェノールブルー）1 ml

1 を各サンプルに加え、6 に設定されたオービタルシェーカー（振盪器）上に2時間置いた。この試料緩衝液は上記強固に結合したプロティナーゼを材料から分離し、これから試料緩衝液自体に存在する。この後、試料緩衝液20マイクロリットルを各容器から取り出し、Heussen C. および Dowdle E. B., Anal. Biochem. 102: 196-202 (1980年) に記載されたようにゼラチン基体 SDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動 (zymography) にかけた。

ゲル上のクリアランス（間隔）の個々のゾーンの面積（これはプロティナーゼ活性による）を Optilab（登録商標）システムにより正確に測定した。これは、各結合実験を繰り返して（n=3）、その結果をスチューデントの T 検定（student's t test）（ここで  $P \leq 0.05$ ）により統計的に分析することによって行った。分析は対照の純粋コラーゲンに対して行った。

図3に示した結果は、コラーゲンと ORC の複合体について MMP 結合の驚くべき統計的改善を実証する。データは、マトリックスメタプロティナーゼ2（グラチナーゼA）とマトリックスメタプロティナーゼ9（グラチナーゼB）のプロ酵素型（PRO2とPRO9）について示されている。いかなる理論にも拘束されることを望まないが、この改善は、複合体形成によりコラーゲンおよび ORC 上の反対の静電的電荷の中和に関係すると考えられる。

#### 手順 4

純粋ORCおよび中和ORC布に対する精製された成長因子の結合を次のようにして調べた。PDGF、EGFおよびFGFの200ファイトログラムの各試料を、INTERCEED（登録商標）および（実施例2からの）中和Interceedの1cm×1cm正方形に加えて、結合しない成長因子の量をHPLCにより測定した。その研究は、成長因子結合に及びイオン強度の効果およびカルボキシル化の効果の両方を調べた。これらORC材料を成長因子と共に1時間37℃でインキュベートし、次に0.05Mまたは0.03MのNaClの2×1mlで5分間洗浄した。この洗浄溶液を棄め、プール（蓄液）し、HPLCにより成長因子につ

いてアッセイ（検定）を行った。その結果を表1に示す。

表 1

Interceed（商標）	pH	COOH%	結合した PDGF%		結合した EGF%		結合した PDGF%	
			低塩	高塩	低塩	高塩	低塩	高塩
Interceed（商標）	2.0	15%	97	87	100	100	97	95
nTCT	5.4	15%	0	0	0	98	84	99
Interceed（商標）	2.0	6%	97	33	91	89	98	64
nTCT	5.4	6% <sup>0</sup>	0	0	100	84	100	84

これらの結果は85%と100%の間のPDGF、FGFおよびEGFがINTERCEEDに結合することを示す。しかしながら、FGFおよびEGFだけが、中和Interceedに結合する。これら成長因子の等電点の差（PDGF=9.6、FGF=10、EGF=4.8）のためEGFが結合しないと考えられる。

以上の実施例はただ例示のみを意図するものである。添付の請求の範囲の範囲内に該当する、多くの他の実施態様が、当業者には明らかだろう。

**FIG. 1**

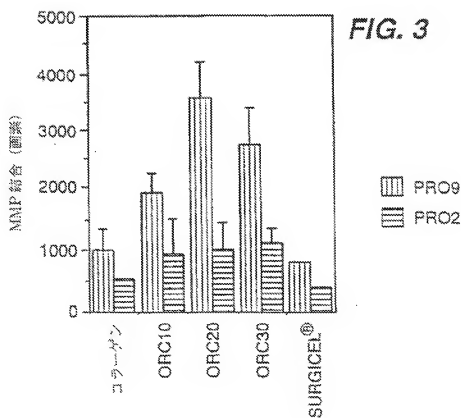
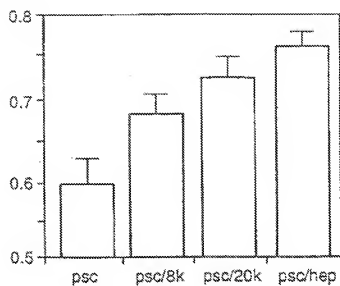


FIG. 2(a)

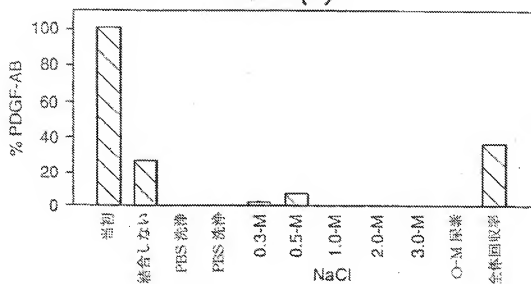


FIG. 2(b)

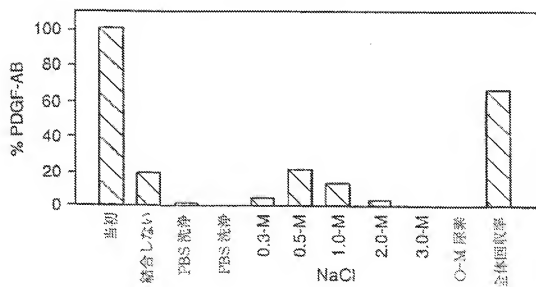


FIG. 2(c)

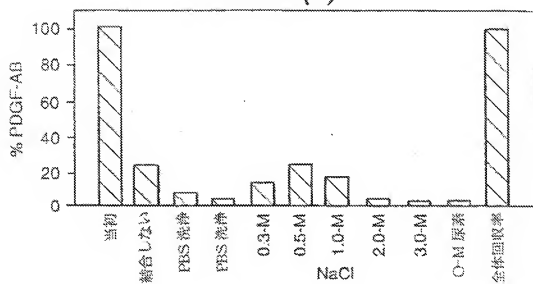
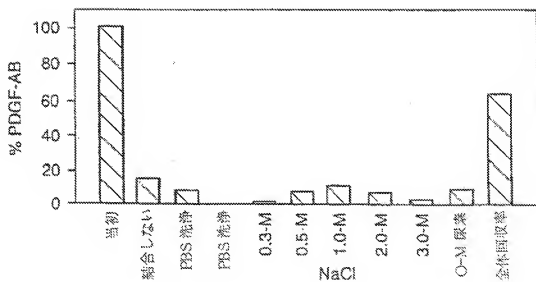


FIG. 2(d)



【手続補正書】特許法第184条の8第1項

【提出日】平成10年7月17日（1998. 7. 17）

【補正内容】

英国特許公開第2280850号は、ORCでもよい生吸収性高分子のフィルムで補強した医薬用コラーゲンを含む無菌病状置用の医薬用インプラントを記載している。このコラーゲンマトリックスは分散したORC繊維もしくは断片を含有してよい。

欧州特許公開第0177064号は、手術用止血材としての編んだ酸化セルロース布の使用を記載している。

欧州特許公開第0562862号は、創傷インプラントとして使用するための生吸収性スポンジ材料を記載している。この材料は、副次構造が中に配向されたコラーゲンスポンジマトリックスを含む。このマトリックスおよび/または副次構造は酸化再生セルロースを含んでよい。そこには機械創傷処置用にそのような材料を使用することについて何ら開示がない。

英国特許公開第1006606号は、ケル状マトリックス中に分散した酸化セルロースクリスタリット凝集物を含む止血性創傷ドレッシングを記載している。そのような止血性ガルの手術における使用が開示されている。

上述のコラーゲンもしくはコラーゲン/多糖創傷ドレッシング材料は重要な利点を与える。これらの材料は（化学的に変更される場合はあるが）天然の生物起源のものであり、したがって低い免疫原性を有する傾向にある。これらの材料は一般的に生吸収性であり、従来の創傷ドレッシング材料の創傷表面からの除去に関連する外傷を減少させる。さらに、これらの材料のいくつかは創傷治癒に対して積極的な治療効果を有することができる。例えば、ヒアルロン酸等のいくつかの動物性ムコ多糖は、繊維芽細胞等の創傷治癒細胞に対して活性化効果を及ぼし、それによりこのような細胞の増殖と募集を促進すると考えられている。しかしながら、この一般型の改善された創傷ドレッシング材料であって、物理特性と生物吸収速度の一層良好な調節、創傷治癒に対する一層良好な治療効果およびコスト低減を示すものに対し、依然としてニーズがある。

本発明の一つの目的は、哺乳動物、特にヒトの慢性創傷、例えば、静脈性潰瘍(venous ulcers)、褥瘡性潰瘍(decubitus ulcers)、糖尿病性潰瘍(diabetic ulcers)用の改修された創傷ドレッシング材料を提供することである。そのような慢性創傷は出血(bleeding)や他の体組織への癒着(adhesion)をほとんど示さないか、全く示さないのが一般的であり、従って、そのような創傷の処置に対して酸化セルロースはこれまで示されていない。

このタンパク質の酸化セルロースに対する重量比は1:99乃至99:99:1であることが好ましい。その重量比は1:10乃至99:9:1の範囲にあることがより好ましく、また2:1乃至95:1の範囲にあることがさらに好ましい。

本発明による材料は、粉末(powder)、小粒(microspheres)、薄片(fleaks)、マツト、膜(film)等のどのような便利な形態でもよい。しかし、本発明による材料は、局所適用するための半固体状またはゲル状の軟膏の形態、あるいは凍結乾燥または凍結乾燥したスポンジの形態であることが好ましい。

この創傷ドレッシング医薬品は、慢性創傷に対して局所適用するための滅菌包装した半固体状またはゲル状軟膏であることが好ましく、ここにおいて前記軟膏は0.05%W/V乃至50%W/Vの酸化セルロースを含む。

この軟膏は医薬上許容可能なキャリア中に、好ましくは0.1%W/V乃至20%W/V、より好ましくは1%W/V乃至10%W/Vの酸化セルロースを含む。適切なキャリアとして、ヒドロキシエチルセルロース、ヒドロキシメチルセルロース、カルボキシメチルセルロース、ヒドロキシプロピルメチルセルロース、それらの混合物等のセルロース誘導体を含むヒドロゲル、およびポリアクリル酸(カーボポール(Carbopol®))を含むヒドロゲルが挙げられる。また、適切なキャリアとして、局所医薬製造のために使用されるクリーム/軟膏、例えば、セトマクロゴール(cetomacrogol)乳化軟膏をベースにしたクリームも挙げられる。上記キャリアは、アルギン酸塩(濃縮剤または稠化剤として)、ベンジルアルコール等の保存料、リン酸水素二ナトリウム/リン酸二水素ナトリウム等のpHを調節するための緩衝液、塩化ナトリウム等の浸透性を調節するための薬



剤、EDTA等の安定化剤を含んでもよい。

この軟膏中の酸化セルロースは、本願で記載するようにタンパク質と複合体形成するのが好ましい。

あるいは、この創傷ドレッシングは、慢性創傷に対して適用するための凍結乾燥または溶媒乾燥した生吸水性スポンジであり、前記スポンジは0.1W/W%乃至50%W/Wの酸化セルロースと、50%W/W乃至99.9%W/Wの1種以上の構造タンパク質を含む。前記スポンジの平均孔径は10 $\mu$ m乃至500 $\mu$ mの領域にあるのが好ましく、約100 $\mu$ m乃至300 $\mu$ mの領域にあるのがより好ましい。

#### 請求の範囲

1. 慢性創傷処置用の医薬品の製造のための酸化セルロースの使用。
2. 酸化セルロースは創傷液に溶けない、織った繊維体、織らない繊維体または編んだ繊維体の形態である請求項1に記載の使用。
3. 前記酸化セルロースは分散された繊維または粉末の形態である請求項1または請求項2のいずれか1項に記載の使用。
4. 前記繊維または粉末は局所適用するための半固体状賦形剤中に分散される請求項3に記載の使用。
5. 酸化セルロースの平均分子量は50,000よりも大きい請求項1乃至請求項4のいずれか1項に記載の使用。
6. 酸化セルロースは酸化再生セルロース(ORC)を含む請求項1乃至請求項5のいずれか1項に記載の使用。
7. 酸化セルロースは構造タンパク質と複合体形成する請求項1乃至請求項6のいずれか1項に記載の使用。
8. 酸化セルロースとタンパク質(存在する場合)は合わせて該材料の少なくとも75重量%を構成する請求項7に記載の使用。
9. 酸化セルロースとタンパク質(存在する場合)は合わせて該材料の少なくとも90重量%を構成する請求項8に記載の使用。

10. 該材料は凍結乾燥または超臨乾燥したスポンジである請求項7、請求項

8または請求項9に記載の使用。

11. 該材料は固体状フィルムである請求項7、請求項8または請求項9に記載の使用。

12. タンパク質の酸化セルロースに対する重量比は1:99乃至99:99:1である請求項7乃至請求項11のいずれか1項に記載の使用。

13. タンパク質の酸化セルロースに対する重量比は1:10乃至99:9:1である請求項12に記載の使用。

14. タンパク質はコラーゲン、フィブロネクチン、フィブリン、ラミニンまたはエラスチンを含む請求項7乃至請求項13のいずれか1項に記載の使用。

15. タンパク質は実質的にコラーゲンより成る請求項14に記載の使用。

16. タンパク質は、分子量が5,000乃至100,000の範囲にある部分加水分解された可溶性コラーゲンである請求項14または請求項15に記載の使用。

17. コラーゲンは線維性の実質的に不溶なコラーゲンである請求項14または請求項15に記載の使用。

18. 酸化セルロースは、分子量が5,000乃至50,000の範囲にある水溶性の酸化セルロース断片を含む請求項1乃至請求項17のいずれか1項に記載の使用。

19. 創設傷性創傷は、静脈性潰瘍、褥瘡性潰瘍および糖尿病性潰瘍より成る群から選択される請求項1乃至請求項18のいずれか1項に記載の使用。

20. 生物試料または生物から細胞増殖因子を分離する方法であって、

(i)前記生物試料または生物を、構造タンパク質と共に酸化セルロースを含む材料に生体内または生体外で接触させて、その増殖因子を該材料に結合させること、および

(ii)その結合した増殖因子を該材料から回収することを含む方法。

21. 活性な創傷ドレッシング材料を製造する方法であって、

(i) 酸化セルロースあるいは酸化セルロースと構造タンパク質との複合体を、細胞増殖因子を含有した生物媒体に接触させて、その細胞増殖因子を該材料に結合させる工程、および

(ii) その細胞増殖因子が結合した該材料を洗浄し乾燥して、前記活性創傷ドレッシング材料を形成する工程を含む方法。

22. 前記細胞増殖因子は血小板由来増殖因子を含む請求項20または請求項21に記載の方法。

23. 前記医薬品は慢性創傷に対して局所適用するための滅菌包装した半固体状またはゲル状軟膏であり、前記軟膏は0.05%W/V乃至50%W/Vの前記酸化セルロースを含む請求項1に記載の使用。

24. 前記医薬品は慢性創傷に対して適用するための生吸収性スポンジであり、前記スポンジは0.1%W/W乃至50%W/Wの前記酸化セルロースと50%W/W乃至99.9%W/Wの1種以上の構造タンパク質を含む請求項1に記載の使用。

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

System und Applikationen für

PC1/GB 97/01729

A CLASSIFICATION OF SUBREGISTRARS  
IPC 6 A61L15/28 A61L15/64

According to International Patent Classification (IPC) 12 by both principal classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation required (classification system followed by classification symbols):

IPC 6 A61L

Exposure(s): oropharynx; other: (use previous documentation to the extent that such documents are included in the table provided)

Electronic data have been generated during the information research process and will be made available to research teams upon request.

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages
------------	--

Dispersal in crab spiders

2

EP 0 177 064 A (JOHNSON & JOHNSON PROD  
INC) 9 April 1986  
see claims

12

X

EP 0 562 862 A (JOHNSON & JOHNSON MEDICAL)  
29 September 1993  
see example 3

7.12-15

20

DATABASE WPI  
Section Ch. Week 0948  
Derwent Publications Ltd., London, GB:  
Class A96, AN 89-348621  
XP002045447  
& CS B 704 580 A (MARYSKA S) , 13 October  
1989  
See title

-/-

Further discussions are given in the conclusions of Sect. 6.

☒ Patient family members are listed in annex

<sup>6</sup> *Disorder: consequences of child maltreatment:*

\*A\* does not mean defining the general nature of the act which is not considered as the act of the subject of the sentence.

\*E\* se ardeles nu sunt puse la dispozitie sau nu au fost date autorizatiile necesare.

<sup>12</sup> "The Government has not taken any steps to ensure that the public is not misled by the use of the word 'guarantee' in the name of the company." (The Government's response to the petition.)

\*90\* අනුප්‍රාප්තවූ ප්‍රතිලාභයේ ප්‍රමාණය මෙම මිල ගණන්වලින් මිලිනු ලබන ප්‍රමාණයට වඩා වැඩි නම් එම ප්‍රතිලාභයේ ප්‍රමාණය මෙම මිල ගණන්වලින් මිලිනු ලබන ප්‍රමාණයට සමාන වේ.

<sup>7</sup> In re *disclaimer* proceedings, the time period for filing a disclaimer is not a priority date and not in conflict with the application because it is understood the principle or theory underlying the

"The statement of particular revelation; the binding application thereof be considered novel or patent be considered to involve an inventive step when the document as taken into

14. The statement of Director's resignation, the signed statement of the Director of the Department of the Interior and the statement of the Director of the Department of the Interior are hereby approved and the Director of the Department of the Interior is hereby authorized to execute the same.

<sup>a</sup> Differentiation of the same patient found.

1. 1990年12月1日以前，在北京市区范围内，凡从事过个体工商业经营活动，且符合下列条件的，可认定为个体工商户：

3 November 1997

Field of research of the international research group:

11. 11. 97

Name and mailing address of the IIR:  
Harcourt Patent Office, P.B. 5818 Palatkastr 2  
St. - 2750 NW Highway  
Fort (+951-751) 243-2040, Tx. 31 051 exp. nt.  
Fax: (+91-751) 240-3318

Authorized officer

Cousins-Van Steen, G.

# INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No.

PCT/GB 97/01725

## C. (Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	EP 0 049 469 A (RUHLAND NACHF GMBH DR) 14 April 1982 -----	
A	EP 0 140 596 A (JOHNSON & JOHNSON) 8 May 1985 -----	

Form PCT/ISA/210 (publication of second sheet) 1 July 1993

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

concerning one or more family members

Internat. Application No.

PCT/GB 97/01725

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
EP 0177064 A	09-04-85	US 4626253 A	02-12-86
		AU 4835685 A	10-04-86
		CA 1253321 A	02-05-89
		DE 3583786 A	19-09-91
		HK 17392 A	13-03-92
		JP 1866569 C	26-08-94
		JP 61090668 A	08-06-86
EP 0562862 A	29-09-93	BR 9301312 A	28-09-93
		CA 2092344 A	26-09-93
EP 0049460 A	14-04-82	DE 3037513 A	15-04-82
		AT 5373 T	15-12-83
		CA 1167726 A	22-05-84
		DE 3050567 A	05-05-83
		HK 53486 A	25-07-86
		JP 1035664 B	26-07-89
		JP 1552101 C	23-03-90
		JP 58041559 A	10-03-83
		US 4407787 A	04-10-83
EP 0140596 A	08-05-85	GB 2148901 A	05-06-85
		AU 573626 B	16-06-88
		AU 3380384 A	18-04-85
		CA 1234102 A	15-03-88
		DE 3472263 A	28-07-88
		US 4614794 A	30-09-85

Form PCT/ISA/210 (part 2) Rev. 01/97

(81) 指定国 EP(AT, BE, CH, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE), OA(BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, ML, MR, NE, SN, TD, TG), AP(GH, KE, LS, MW, SD, SZ, UG, ZW), EA(AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, CA, CH, CN, CU, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, GB, GE, GH, HU, IL, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MD, MG, MK, MN, MW, MX, NO, NZ, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL, TJ, TM, TR, TT, UA, UG, US, UZ, VN, YU, ZW

(72) 発明者 コリメール, エレイン

イギリス国、ジー・9・ビー・ビー・カンパニーノールド、パロック、グランジエニック・ガーデンズ 68

(72) 発明者 ワイズマン, デイビッド

アメリカ合衆国、08904 ニュージャージー州、ハイランド・パーク、アンハースト・ストリート 135